

Anomalías de la bomba de calcio en la hipertensión arterial

A. de la Sierra

Unidad de Hipertensión. Servicio de Medicina Interna General. Hospital Clínic. Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona

Introducción

El aumento de las resistencias periféricas vasculares que caracteriza a la fase establecida de la hipertensión arterial esencial depende, fundamentalmente, del tono contráctil de la fibra muscular lisa de la pared vascular. Los avances en el conocimiento de la fisiología celular han puesto de manifiesto el papel central del calcio en la regulación de dicho tono contráctil ¹.

La contracción de las células del músculo liso se inicia por la apertura de canales de calcio dependientes de diferencias de potencial eléctrico o de receptores para agonistas específicos, situados en la membrana celular y en el retículo sarcoplásmico, lo que resulta en un incremento de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico. Dicho aumento es capaz de actuar sobre las proteínas contráctiles del músculo liso (actina y miosina), que cambian su conformación espacial interaccionando entre sí para dar lugar a la contracción celular.

La relajación de la célula muscular es consecuencia directa de la disminución de la concentración de Ca^{2+} libre citosólico, lo que tiene lugar a través de la activación de unos sistemas de transporte activo de calcio capaces de extruir dicho catión al espacio extracelular y a la luz del retículo sarcoplásmico contra su gradiente electroquímico. Se conoce hasta el momento la existencia de dos mecanismos capaces de extraer Ca^{2+} al exterior de la célula. Por una parte, existe un sistema de intercambio Na^+ - Ca^{2+} especialmente desarrollado en las células excitables, como las de la musculatura miocárdica, que utiliza la entrada de tres moléculas de Na^+ desde el exterior, a favor de gradiente, para extraer una molécula de Ca^{2+} . Por otra, una ATPasa Ca^{2+} -dependiente, que utiliza la

energía producida por la hidrólisis del ATP para la extrusión de calcio en contra de su gradiente electroquímico. Dicho sistema de transporte es asimismo el responsable del secuestro de calcio en la luz del retículo sarcoplásmico que da lugar a la relajación de la célula contráctil.

Desde las primeras observaciones de Postnov y cols. ^{2,3} que demostraron un defecto en la captación de calcio por las membranas celulares de animales de experimentación y pacientes afectados de hipertensión arterial primaria, la evidencia acumulada sugiere la existencia, en dichas situaciones, de algún trastorno en el funcionamiento de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente. Si bien la naturaleza intrínseca de esta anomalía no es suficientemente conocida, sí parece plausible que pudiera ser la responsable, al menos en parte, del aumento del calcio libre citosólico que presentan los pacientes afectados de HTA esencial ^{4,5}. El objeto de este capítulo es la revisión del mecanismo de funcionamiento de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente de la membrana celular y las alteraciones que hasta el momento han sido descritas en la hipertensión arterial.

La ATPasa Ca^{2+} -dependiente. La bomba de calcio. Aspectos básicos

Estructura y función de la bomba de calcio

La ATPasa Ca^{2+} -dependiente es uno de los siete u ocho mecanismos de transporte existentes en las membranas celulares que movilizan el calcio entre el interior y el exterior de la célula. Junto con el contra-transporte Na^+ - Ca^{2+} es el principal mecanismo para la extrusión de calcio del citoplasma celular y está presente en la práctica totalidad de las membranas celulares. En general, la ATPasa predomina en las células no excitables y el contra-transporte en las excitables. Ello es debido a que estas últimas requieren un sistema de alta capacidad de transporte, aunque sea en detrimento de la afinidad para el calcio, condiciones que se hallan presentes en el intercambiador Na^+ - Ca^{2+} . Por el contrario, la ATPasa Ca^{2+} -dependiente

Correspondencia: Dr. A. de la Sierra.
Servicio de Medicina Interna General
Hospital Clínic.
Villarroel, 170.
08036 Barcelona.

presenta una alta afinidad para el Ca^{2+} y una menor capacidad de transporte y es, por tanto, la responsable del mantenimiento constante del bajo contenido de calcio existente en el interior celular.

La demostración en 1966 de que los eritrocitos eran capaces de destruir Ca^{2+} gracias a una ATPasa específica⁷ originó un vasto número de trabajos, realizados principalmente en este modelo celular, encaminados a conseguir la caracterización de esta enzima. Se trata de una clásica $\text{E}_1\text{-E}_2$ -ATPasa con una alta afinidad para el Ca^{2+} ($< 1 \mu\text{M}$), que se inhibe específicamente por bajas concentraciones de vanadato ($K_{1/2} < 1 \mu\text{M}$). Gracias a esta alta afinidad está cualificada para extraer Ca^{2+} continuamente de la célula, por lo que juega el papel más importante en el mantenimiento del gradiente de Ca^{2+} entre las células y el medio extracelular.

La ATPasa Ca^{2+} -dependiente es un polipéptido con un peso molecular de 138.000 daltons en su forma monomérica, aunque funciona en la membrana celular como un dímero⁸⁻¹⁰. Su representación en el total de proteínas membranas es baja, con sólo un 0,1-0,2% del total de las mismas, que a su vez constituye únicamente alrededor del 0,5% del peso celular.

En presencia de la enzima reguladora calmodulina, las propiedades de la ATPasa eritrocitaria, aquella que ha podido ser mejor estudiada, son relativamente bien conocidas. La bomba transporta, aparentemente, el equivalente al flujo pasivo de Ca^{2+} , que se cifra en unos $50 \mu\text{mol/l célula/h}$ a una concentración interna de Ca^{2+} inferior a los $30 \text{ nmol/l células}$ ¹¹. Si tenemos en cuenta que la concentración extracelular de Ca^{2+} se halla alrededor de $1,3 \text{ mmol/l}$, puede establecerse un gradiente en contra de 40.000. De este modo puede afirmarse que únicamente una pequeña parte de la capacidad de la bomba se utiliza habitualmente. Si la concentración de calcio intracelular se satura ($10 \mu\text{mol/l células}$), la velocidad de transporte puede alcanzar los $20 \text{ mmol/l células/h}$, lo que corresponde a varios miles de unidades por minuto. La afinidad para el calcio es alta en el interior (inferior a $1 \mu\text{M}$) y baja en el exterior de la membrana (10 mM)¹².

El sistema hidroliza ATP a la misma velocidad a la que se transporta el calcio (1 átomo de calcio transportado por molécula de ATP hidrolizado)¹³. Existen dos sitios o locus de fijación del ATP. El locus enzimático propiamente dicho presenta una afinidad de $2\text{-}3 \mu\text{M}$, operando aisladamente a una décima parte de su capacidad. Además, existe otro locus regulador para el ATP con una afinidad entre 200 y $300 \mu\text{M}$, que cuando está ocupado permite el funcionamiento a velocidad máxima¹⁴.

Es importante destacar que el sistema requiere la presencia del ion Mg^{2+} para su operatividad. La afini-

dad para el Mg^{2+} en el interior de la membrana es de $15 \mu\text{M}$ ¹⁵, lo que no implica que el sistema transporte este catión. De hecho, la especificidad de la bomba para el calcio es altamente selectiva, permitiendo únicamente el Sr^{2+} y, posiblemente, el Pb^{2+} como alternativa al transporte de Ca^{2+} ¹⁶.

Está claramente establecido que la bomba de calcio no contratransporta ningún otro catión al interior celular, aunque inicialmente se había postulado su intercambio por Na^+ , K^+ o Mg^{2+} , ni es intercambiado por un ningún anión¹⁷. No obstante, evidencias experimentales recientes sugieren la posibilidad de un intercambio por protones, es decir, que el sitio móvil de fijación del Ca^{2+} volvería al interior celular unido a un H^+ ¹⁸. Ello viene apoyado por el hecho de que cuando se bloquea el transportador de aniones con DIDS, aquellos aniones que pasan la membrana en forma no disociada, como el acetato, estimulan el transporte de calcio, mientras que los que la atraviesan en forma ionizada, como el tiocianato, no presentan esta propiedad.

El ciclo de reacción de la bomba de calcio (fig. 1) es similar al de otras ATPasas como la bomba de sodio. Básicamente, la hidrólisis del ATP fosforila la proteína en presencia de calcio. La proteína fosforilada cambia su conformación de $\text{E}_1\text{-P}$ a $\text{E}_2\text{-P}$, cambio que se ve favorecido por la presencia de Mg^{2+} ¹⁹. Durante este cambio de conformación el Ca^{2+} es extruido al exterior para posteriormente desfosforilarse la proteína y volver a su conformación inicial.

La interacción de la bomba de calcio con la calmodulina

Una importante característica de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente es su capacidad de estimulación por la acción de la calmodulina^{20,21}, proteína soluble intracelular con cuatro locus de fijación para el Ca^{2+} que se halla presente en el interior de todas las células y es la encargada de mediar en varias de las acciones en las que el Ca^{2+} actúa como segundo mensajero. La calmodulina estimula la bomba de calcio cuando varios de sus locus de fijación para este catión son ocupados. Esta reacción provoca una interacción calmodulina-bomba de calcio que resulta en un incremento de hasta 30 veces de la afinidad de esta última para el Ca^{2+} ²². Para algunos autores²³, la ATPasa Ca^{2+} -dependiente tendría dos configuraciones: una forma asociada a la calmodulina y otra disociada de ésta. La forma disociada representaría un estado de baja afinidad donde la actividad máxima se consigue por una concentración de calcio libre comprendida entre 100 y $300 \mu\text{M}$, presentando un solo locus de fijación para el calcio. Por el contrario, en su forma

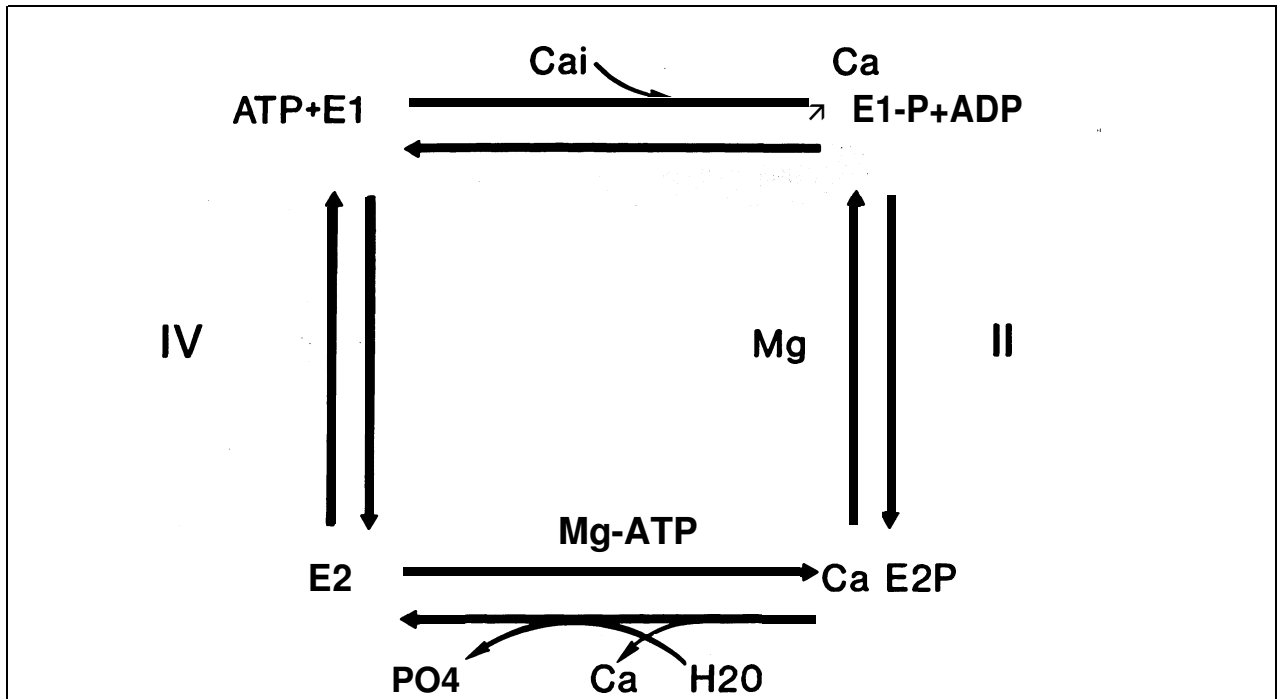


Fig 1.- Ciclo de reacción de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente. El ciclo comienza en el extremo superior izquierdo y sigue el sentido horario. E1 Y E2 representan las dos conformaciones de la proteína y E1-P y E2-P las formas fosforiladas. El Ca^{2+} atraviesa la membrana celular durante la reacción II. Dicha reacción requiere la presencia de Mg^{2+} , mientras que la III necesita altas concentraciones de ATP.

asociada a la calmodulina la bomba de calcio se convierte en una enzima de alta afinidad que alcanza su máxima actividad para una concentración de calcio libre citosólico de 10 a 50 μM y donde el número de locus de fijación para el calcio es de tres. El papel fisiológico de la regulación de la bomba de calcio por la calmodulina no está suficientemente aclarado. Para algunos autores, la ATPasa Ca^{2+} dependiente en su estado basal estaría disociada de la calmodulina y sería el aumento del calcio intracelular el que provocaría, a través de la ocupación de los loci específicos de la calmodulina, la asociación a la ATPasa Ca^{2+} -dependiente y el consiguiente aumento de su afinidad para el Ca^{2+} y de su velocidad máxima. Ello obtendría el resultado deseado, es decir, el restablecimiento de la concentración basal de calcio y, alcanzado dicho objetivo, la calmodulina se disociaría de nuevo de la bomba. Este fenómeno tiene implicaciones reguladoras, pues la calmodulina actuaría como un activador capaz de modificar la conformación de la enzima desde un estado de baja afinidad para el Ca^{2+} y baja velocidad de bombeo a un estado de características diametralmente opuestas. No obstante, otros autores ponen en duda esta hipótesis²⁴ y sugieren que en su estado basal el 98% de las unidades de la bomba de calcio estarían unidas a la calmodulina, con lo que el papel regulador de esta proteína intracelular sería prácticamente nulo.

Regulación de la bomba de calcio

Dejando aparte la regulación de la bomba de calcio por la calmodulina, que actúa como un mecanismo de *feed-back* negativo ante los aumentos del calcio libre citosólico, las características funcionales de la ATPasa de la membrana plasmática dependen en gran medida del ambiente lipídico en el que se halla inmersa²⁵. Los fosfolípidos, ya sean neutros o con carga negativa, son esenciales para su funcionamiento enzimático en condiciones basales²⁶. Si se reconstruye la ATPasa con un fosfolípido neutro como la fosfatidilcolina, la adición de otros fosfolípidos con carga negativa como la fosfatidilserina, el fosfatidilinositolmonofosfato o el fosfatidilinositolbifosfato son capaces de estimular de forma adicional la actividad de la ATPasa²⁷. Si bien no está probado que esta regulación tenga algún papel fisiológico, sí parece factible que el fosfatidilinositolmonofosfato sea un regulador del transporte de Ca^{2+} por la bomba de la membrana celular.

Se ha descrito que el GMP cíclico ejerce un efecto estimulador sobre el transporte transmembranario de calcio y que dicho efecto se produce mediante una fosforilación directa de la enzima²⁸. No obstante, otros autores²⁹ han demostrado que dicha enzima fosforilada no tiene las características de la bomba de calcio y que, probablemente, se trata de la quinasa de la cadena ligera de la miosina. Esta quinasa depen-

diente del GMPc sí es capaz de estimular el transporte de calcio por la bomba, probablemente a través de la formación de fosfatidilinositolmonofosfato. De igual manera, aquellos agentes capaces de estimular la síntesis de GMPc, tales como el factor relajante dependiente del endotelio, el factor natriurético auricular o los compuestos de óxido nítrico, pueden disminuir el calcio libre citosólico a través de una estimulación indirecta de la actividad de la bomba de calcio²⁹.

Dependiendo del modelo celular existen diversas sustancias que pueden modular la actividad de esta enzima. La insulina es capaz de inhibir el transporte de calcio por la ATPasa³⁰ en la membrana de los adipocitos, mientras que en las células intestinales la 1,25-hidroxivitamina D₃ es capaz de activarlo³¹. En las células del miometrio, la oxitocina tiene funciones inhibitorias³² mientras que en los eritrocitos las hormonas tiroideas son estimuladoras³³. Asimismo, se ha postulado recientemente que el efecto tóxico del cadmio sería debido a una inhibición de la bomba de calcio de la membrana celular³⁴.

La bomba de calcio del retículo sarcoplásmico

En el retículo sarcoplásmico, la enzima responsable de introducir el Ca²⁺ libre citosólico en su interior es una ATPasa del mismo tipo que la de la membrana plasmática, que interacciona con el Ca²⁺ con una alta afinidad (< 0,5, μM) y con una estoiquiometría para el ATP de 2:1. Puesto que esta ATPasa es muy abundante en la membrana del retículo sarcoplásmico, superior al 90% del total de las proteínas de membrana en algunos músculos esqueléticos, la organela puede captar rápidamente grandes cantidades del Ca²⁺ citosólico (de 20 a 40 nmol por miligramo de proteína de membrana y por segundo). La ATPasa Ca²⁺-dependiente del retículo sarcoplásmico ha sido purificada y se trata de un polipéptido con un peso molecular de 115.000 daltons³⁵. Es capaz de estimularse también por la calmodulina, pero a diferencia de la ATPasa de la membrana celular, en que la estimulación es debida a la interacción directa del activador con la bomba, en el retículo sarcoplásmico esta activación está mediada por una quinasa calmodulina-dependiente. La regulación de la ATPasa Ca²⁺-dependiente del retículo sarcoplásmico se lleva a cabo por el fosfolamban, proteína presente tanto en el músculo cardíaco como en el músculo liso o esquelético³⁶⁻³⁸. El fosfolamban ejerce su acción a través de la fosforilación mediada por diversas kinasas, ya sean dependientes de AMPc, de la calmodulina o del GMPc^{38, 39}. De este modo, y al igual que sucedía con la bomba de calcio de la membrana citoplásmica, aquellas sustancias capaces de estimular el ciclo de

las proteínas G y del fosfatidilinositol, como el factor natriurético auricular, el factor relajante dependiente del endotelio o incluso los betabloqueantes, pueden ejercer su efecto de relajación por esta vía²⁹.

Anomalías de la bomba de calcio en la hipertensión arterial

Alteraciones de la fijación de calcio por las membranas celulares

En 1979, Postnov y cols.⁸ demostraron una disminución de la fijación del calcio por parte de las membranas eritrocitarias de pacientes afectados de HTA esencial y ratas hipertensas espontáneas. Trabajos posteriores en vesículas constituidas por fragmentos de membrana pusieron de manifiesto que este defecto afectaba únicamente a la superficie interna de la membrana citoplasmática^{40,41}, conclusión confirmada en otros experimentos en los que se utilizaron ionóforos de Ca²⁺⁴².

Este defecto en la fijación del Ca²⁺ no parece estar limitado a las membranas eritrocitarias. Estudios realizados en ratas hipertensas espontáneas han demostrado las mismas alteraciones en células del músculo liso vascular^{40,43,44}, miocardio^{40,45}, hepatocitos⁴⁶, adipocitos⁴⁷ y sinaptosomas⁴⁶. Dichas alteraciones pueden ser debidas a una disminución del número de lugares de fijación para el calcio o a un descenso de la afinidad para este catión⁴⁶.

Entre los posibles grupos membranarios de fijación para el calcio cabe considerar a aminoácidos tales como los ácidos glutámico y aspártico, los grupos carboxílicos y los fosfolípidos con carga negativa como el fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina^{48,49}. De hecho, el 20% del calcio membranario se halla unido a dichos fosfolípidos. No obstante, por lo que respecta a la composición lipídica de las membranas eritrocitarias, no parecen existir diferencias entre individuos o animales normotensos y pacientes hipertensos esenciales o ratas hipertensas espontáneas, aunque resulta difícil extrapolar estos datos a otros modelos celulares⁵⁰.

Aparte de los grupos membranarios de fijación para el calcio, el citoplasma celular contiene varias sustancias capaces de unirse a dicho catión. No obstante, la mayoría de ellas se caracteriza por poseer valores de constante de disociación para el calcio del orden de 2 ó 3 magnitudes superiores a los posibles cambios de la concentración de calcio en condiciones fisiológicas. En este contexto, únicamente las proteínas de fijación altamente selectivas, tales como la troponina, parvalbúmina o la calmodulina pueden tener un cierto papel regulador⁵⁰.

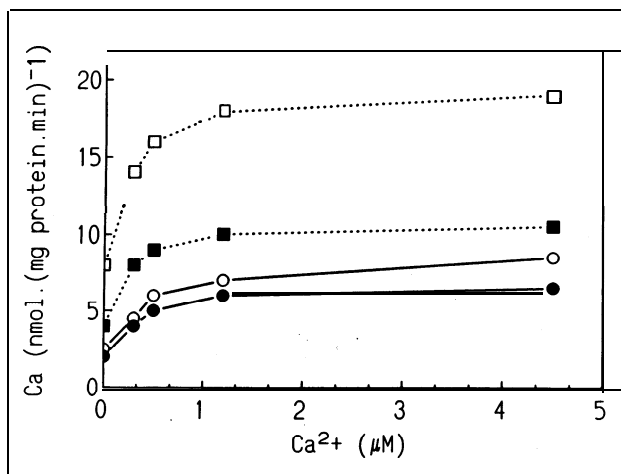


Fig. 2.-Acumulación de Ca^{2+} por preparados de vesículas "inside-out" de membranas eritrocitarias en función de la concentración de Ca^{2+} en el medio de incubación. Las líneas continuas representan el estado basal y las de puntos el transporte tras la adición de calmodulina ($2\mu\text{g/ml}$). Los círculos y cuadrados vacíos se refieren a las ratas normotensas (Wistar-Kyoto), y los llenos a las ratas hipertensas espontáneas. (Tomado de Orlov y cols. Pflugers Arch 397:54-56, 1983).

Los estudios realizados hasta el momento no han puesto de manifiesto diferencias en la concentración citoplasmática, propiedades o distribución de la calmodulina entre hipertensos y normotensos⁵¹, aunque, como se discutirá posteriormente, parece existir un defecto en la estimulación por parte de la calmodulina del transporte de calcio mediado por la ATPasa Ca^{2+} -dependiente⁵²⁻⁵⁴.

El fallo en la demostración de que las propiedades físico-químicas de la membrana celular sean responsables del defecto de fijación del calcio obliga a asumir que la alteración debe residir en el transporte activo de dicho catión. Si tenemos en cuenta que el principal responsable del mantenimiento de la baja concentración de calcio libre citosólico lo constituye la bomba de calcio de la membrana celular y del retículo sarcoplásmico, parece lógico pensar que un defecto en dicho sistema de transporte pueda jugar un papel relevante en la hipertensión arterial primaria.

Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial experimental

Los primeros trabajos que estudiaron el transporte activo de Ca^{2+} fueron publicados en 1983 por el grupo de Postnov⁵³ y se efectuaron sobre preparados de membranas eritrocitarias formando vesículas, en las

que la superficie interna de la membrana se hallaba expuesta al medio extracelular, las llamadas «inside-out vesicles». En estos experimentos, los autores demostraron una disminución del transporte activo de Ca^{2+} estimulado por la calmodulina en las ratas hipertensas espontáneas⁵³. Si bien la velocidad de acumulación de calcio en condiciones basales no presentaba diferencias significativas entre las especies de ratas hipertensas y normotensas, la adición de calmodulina al medio extracelular provocaba una estimulación máxima del transporte activo de Ca^{2+} significativamente mayor en las ratas normotensas que en sus homónimas hipertensas (fig. 2). Los autores sugerían que el incremento en el contenido intracelular de calcio observado en la HTA podía ser consecuencia de este déficit de estimulación, bien por un fallo en la interacción de las moléculas de la calmodulina y de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente, bien por una alteración en el medio fosfolipídico de la membrana en el que la bomba se halla inmersa.

La extrapolación de estos resultados a otros modelos celulares fue realizada por los mismos autores al estudiar sinaptosomas cerebrales de ratas hipertensas espontáneas⁵⁴ y por otros al estudiar membranas de células miocárdicas de la misma especie⁵⁵. No obstante, en este último trabajo se pudo observar que la actividad basal de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en membranas desprovistas de calmodulina era mayor en las ratas hipertensas que en las normotensas.

Otros modelos de animal de experimentación con HTA de origen genético parecen poseer las mismas características por lo que respecta al transporte de Ca^{2+} . Así, Vezzoli y cols.⁵⁶ publicaron un estudio en 1985 en el que se estudiaba el transporte activo de Ca^{2+} en preparados de membranas eritrocitarias de ratas hipertensas de la cepa de Milán. Esta estirpe de animales se caracteriza por desarrollar HTA de forma genética, aunque difiere de las ratas hipertensas espontáneas clásicas en el funcionamiento de sus sistemas de transporte y en su homeostasis iónica. Así, las ratas hipertensas espontáneas clásicas presentan una inhibición del cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}$ ⁵⁷ y una tendencia a incrementar el contenido intracelular de Na^+ cuando son sometidas a una sobrecarga salina. Este incremento del Na^+ intracelular podría condicionar, en otras células diferentes a los eritrocitos, una disminución del transporte de Ca^{2+} y un aumento del Ca^{2+} libre citosólico a través de una inhibición del contranporte $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ ⁵⁸.

Sin embargo, las ratas hipertensas milanesas poseen un cotransporte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}$ hiperactivo y una disminución del Na^+ intracelular⁵⁹, por lo que no podría aducirse este mecanismo para la inhibición del transporte de Ca^{2+} . En el grupo de ratas hipertensas milanesas estudiadas por Vezzoli y cols.⁵⁶, la actividad basal de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en ausencia

de calmodulina se encontró ligeramente aumentada, si bien las diferencias con las ratas normotensas no eran estadísticamente significativas. Por el contrario, la adición al medio extracelular de calmodulina estimulaba de forma significativamente superior el transporte activo de Ca^{2+} en las ratas normotensas. El análisis cinético de dicho transporte mostraba una reducción del 30% en la rata hipertensa milanesa por lo que respecta a la velocidad máxima, sin diferencias en la afinidad para el calcio entre ambas especies. Similares resultados fueron referidos posteriormente por Cirillo y cols.⁶⁰ en el mismo modelo experimental, así como por otros autores, estudiando el músculo liso de las ratas Dahl sal-sensibles en condiciones de sobrecarga salina⁶¹.

Una de las principales críticas que se pueden aducir a estos trabajos es la utilización de preparados de membrana en un medio artificial. Si bien los estudios realizados hasta el momento muestran resultados prácticamente superponibles, no es menos cierto que las condiciones metodológicas empleadas reflejan escasamente la fisiología celular⁶². Teóricamente, las condiciones idóneas para la medida de la actividad de la bomba de calcio deberían realizarse en células intactas. Por lo que respecta a la medida de esta actividad en la hipertensión experimental, caben destacar dos trabajos publicados hasta el momento.

Dagher y cols.⁶³ desarrollaron en 1987 una nueva metodología para el estudio de las propiedades cinéticas de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en hematíes intactos. Los hematíes eran expuestos a la presencia del ionóforo A23187, capaz de aumentar la permeabilidad pasiva de la membrana celular para los cationes divalentes y promover una acumulación intracelular de Ca^{2+} . La adición al medio de cloruro de cobalto bloquea de manera inmediata todos los movimientos de calcio a través del ionóforo A23187, sin afectar la extrusión activa de calcio a través de la bomba. La aplicación de dicha metodología al estudio de la hipertensión experimental no fue capaz de poner de manifiesto diferencias significativas en la afinidad para el calcio o en la velocidad máxima de transporte en las ratas hipertensas espontáneas, tal como puede observarse en la [tabla I](#).

Finalmente, Orlov y cols.⁶⁴, utilizando una tecnología diferente, en la que los eritrocitos son cargados con el quelante de calcio Quin-2 y la ATPasa bloqueada por la adición de Na_3VO_4 , no consiguieron demostrar diferencias significativas en la actividad basal de la bomba de calcio en dos tipos de ratas con hipertensión genética, las ratas hipertensas espontáneas y las ratas hipertensas milanesas. Asimismo, la adición de R24571, un inhibidor de las acciones mediadas por la calmodulina, no provocaba diferencias en la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo que dichos autores concluían que, al contrario de lo que

Tabla I. Velocidad máxima de flujo (V_{max} en mmol/l céls/h) y concentración intracelular de Ca^{2+} requerida para alcanzar el 50% de la velocidad máxima ($K_{0.5}$ en $\mu\text{mol/l}$ céls) en los controles normotensos, hipertensos esenciales, ratas normotensas Wistar-Kyoto y ratas hipertensas espontáneas. Tomado de Dagher y cols. *Biochim Biophys Acta* 903:218-228, 1987.

	V_{max}	$K_{0.5}$
Controles normotensos	16,9 ± 3,1	1 6,2 ± 7,9
Ratas Wistar- Kyoto.....	25,1 ± 12,1	12,1 ± 4,9
Hipertensos esenciales.	15,6 ± 6,6	21 ,0 ± 11,2*
Ratas hipertensas espontáneas.....	30,0 ± 12,9	11,7 ± 5,3

* $p < 0,1$ al comparar con los controles normotensos.

sucedía en los preparados de membrana, la calmodulina no jugaba un papel significativo en el transporte de calcio en las células intactas. Por otra parte, estos mismos autores sugerían que el aumento del calcio intracelular en la hipertensión arterial podría ser debido a un incremento en el influjo pasivo de este ion. A conclusiones parecidas llegaban Oshima y cols.⁶⁵ al estudiar plaquetas de ratas con HTA primaria.

En resumen, de los estudios llevados a cabo en la hipertensión experimental puede deducirse que, si bien parece existir un defecto en la interacción entre la calmodulina y la bomba de calcio que condiciona una disminución de la extrusión de este catión cuando se utilizan preparados de membrana plasmática, este defecto no se reproduce al estudiar células intactas, donde el papel que juega la calmodulina en la activación de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente no está bien definido.

Alteraciones de la bomba de calcio en la hipertensión arterial esencial

La investigación de la actividad de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente en la HTA esencial ha corrido pareja a la de la HTA experimental. La diferencia básica es que prácticamente todos los trabajos se han realizado en células circulantes por razones obvias.

Nuevamente fue el grupo de Postnov^{51,54} el que demostró una disminución del transporte activo de Ca^{2+} estimulado por la calmodulina en membranas eritrocitarias de pacientes afectos de HTA esencial. Los resultados obtenidos fueron superponibles a los hallados en las ratas hipertensas espontáneas. En preparados de membrana sometidos a depleción de calmodulina no se observaron diferencias en el transporte activo de calcio, ni en la afinidad de la ATPasa para el Ca^{2+} ni en la velocidad máxima de transporte. Por el contrario, la adición de calmodulina (2

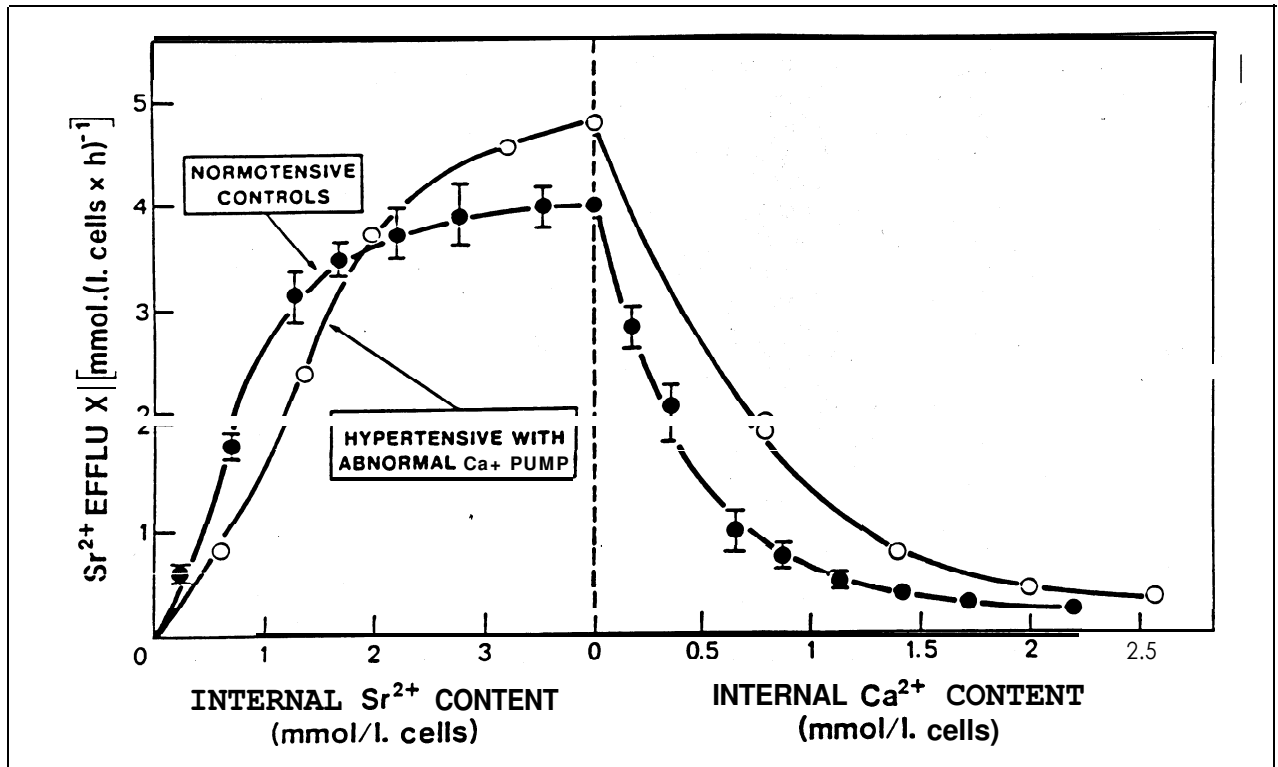


Fig. 3-Estimulación del flujo de Sr²⁺ por el aumento en la concentración intracelular de Sr²⁺ (izquierda) e inhibición por el aumento en la concentración de Ca²⁺ (derecha). Un ejemplo de un paciente hipertenso Ca²⁺ bomba (-) se compara con la media obtenida en 20 controles normotensos. Puede observarse que en este paciente la curva de estimulación del flujo de Sr²⁺ se halla desplazada a la derecha, reflejando un aumento de la constante de disociación para el Sr²⁺ intracelular (K_{Sr}), alcanza mayores valores de velocidad máxima (V_{max}) y la curva de inhibición por el Ca²⁺ intracelular se halla asimismo desplazada a la derecha, lo que indica un aumento en la constante de disociación para el Ca²⁺ intracelular (K_{Ca}). (Tomado de De la Sierra y cols. J Hypertens 8:285-29.3, 1990).

µg/ml), independientemente de su origen, provocaba un aumento tanto de la afinidad para el Ca²⁺ como de la velocidad máxima, que era claramente superior en los individuos normotensos respecto a los hipertensos esenciales. Mientras que en los pacientes afectados de HTA esencial la adición de calmodulina duplicaba la velocidad máxima de transporte y triplicaba la afinidad para el Ca²⁺ ambos parámetros se multiplicaban por 5 en los preparados de membranas eritrocitarias de los individuos normotensos. La conclusión final fue que debía existir un defecto en la interacción de la calmodulina con la bomba de calcio de las membranas eritrocitarias. La extrapolación de este defecto a otros modelos celulares presuntamente implicados en la HTA esencial venía dada por los resultados obtenidos en ratas hipertensas espontáneas, ya discutidos previamente.

Estos resultados fueron confirmados posteriormente por otros autores. Así, Olorunsogo y cols.⁶⁶ corroboraban que los eritrocitos de los pacientes hipertensos esenciales presentaban una estimulación del

transporte activo de Ca²⁺ que representaba el 50% de la obtenida en los individuos normotensos. Igualmente, Resinck y cols.⁶⁷, al estudiar plaquetas de pacientes con HTA esencial, encontraron una disminución de la estimulación del transporte de Ca²⁺ por la calmodulina, si bien la actividad basal de la ATPasa se encontraba aumentada en estos pacientes.

Contrariamente a estos resultados, Vincenzi y cols.⁶⁸, al estudiar un grupo de 36 hipertensos esenciales, detectaron una disminución de la actividad basal de la ATPasa asumida como la actividad resistente a la inhibición por la trifluoperazina, conocido inhibidor de las acciones de la calmodulina⁶⁹. Por el contrario, en ausencia de dicho inhibidor y asumiendo que estas condiciones representaban la actividad máxima de la ATPasa, no se encontraron diferencias entre normotensos e hipertensos.

En un trabajo ya comentado anteriormente, Dagher y cols.⁶³, en el primer estudio utilizando el hematíe intacto de ratas hipertensas espontáneas y pacientes hipertensos esenciales, concluían que no existían alte-

Tabla II. Parámetros cinéticos de la bomba de calcio eritrocitaria en la HTA esencial

	Controles normotensos (N = 20)	Hipertensos esenciales (N = 22)
V_{max}	$5,0 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,4$
K_{Ca}	394 ± 23	480 ± 61
K_{Ca}	55 ± 3	$73 \pm 7^*$

V_{max} : velocidad máxima del flujo de Sr^{2+} . K_{Ca} : constante de disociación aparente para el Sr^{2+} intracelular. K_{Ca} : constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular total.

raciones evidentes ni en la velocidad máxima de transporte ni en la afinidad para el Ca^{2+} de la ATPasa Ca^{2+} -dependiente eritrocitaria en la HTA esencial (tabla I). Un análisis más detallado de estos resultados revelaba, no obstante, pequeñas diferencias en el sentido de una tendencia por parte de los pacientes afectados de HTA esencial a presentar valores de afinidad para el Ca^{2+} intracelular inferiores a la población normotensa. De hecho, los propios autores reflejaban en la discusión de sus resultados la posibilidad de que un pequeño subgrupo de pacientes sí presentaran alteraciones en la ATPasa Ca^{2+} -dependiente.

Con la intención de clarificar la controversia concerniente a una posible alteración de la bomba de calcio en la HTA esencial, llevamos a cabo un estudio cinético de dicho sistema de transporte en eritrocitos intactos de 22 pacientes hipertensos esenciales y 20 individuos sanos normotensos⁷⁰. Para ello desarrollamos una nueva tecnología basada en el uso del Sr^{2+} como análogo del Ca^{2+} para la bomba de Ca^{2+} ⁷¹⁻⁷⁵. Las concentraciones intracelulares de Sr^{2+} y Ca^{2+} se modificaron utilizando el ionóforo A23187 en una solución isotónica Ringer^{76,77}. Para cada sujeto estudiado se prepararon de 8 a 12 alícuotas de células conteniendo diferentes concentraciones intracelulares de Sr^{2+} y de Ca^{2+} . Las 4-6 primeras con concentraciones crecientes de Sr^{2+} (0,2-3 mmol/l células) y las 4-6 siguientes con concentraciones crecientes de Ca^{2+} (0,1-2 mmol/l células) y una concentración fija de Sr^{2+} equivalente a la máxima alcanzada en las anteriores. Para la medida del flujo de Sr^{2+} , las alícuotas se suspendieron en el mismo medio Ringer con la adición de $MgCl_2$ 1 mmol/l, necesario para el funcionamiento de la bomba de Ca^{2+} , y se incubaron a 37°C durante 15 minutos bajo agitación continua.

Para cada sujeto estudiado, el flujo de Sr^{2+} se representó en función de la concentración intracelular de Sr^{2+} (fig. 3, izquierda). Tal como se ha descrito previamente para el Ca^{2+} ⁷⁸, la estimulación del flujo de Sr^{2+} por el aumento en la concentración intracelular de dicho ion es claramente sigmoide, y en dicha parte de la curva es posible calcular la constante de disociación para el Sr^{2+} y la velocidad máxima de flujo. Asimismo, el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} provoca una inhibición competitiva del

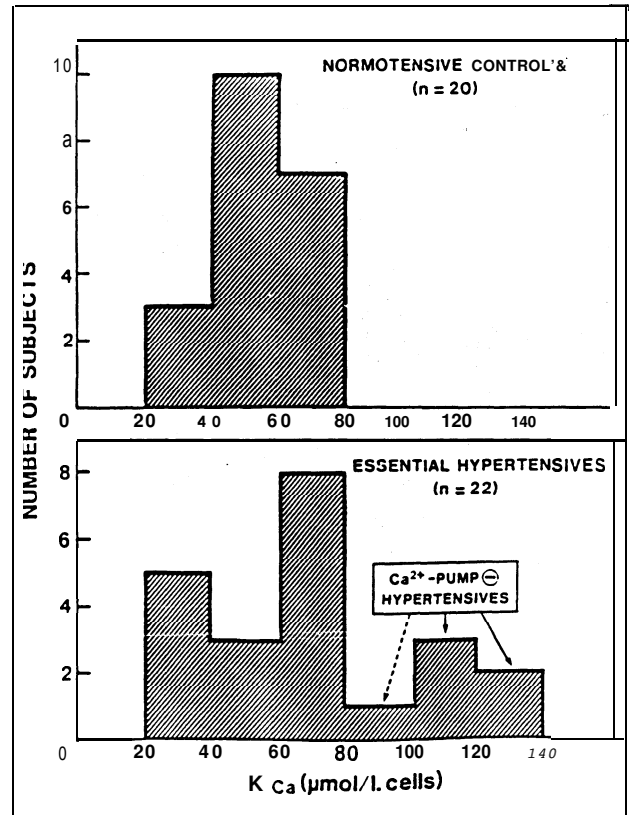


Fig. 4.-Valores individuales de la constante de disociación aparente para el Ca^{2+} intracelular (K_{Ca}) en los sujetos normotensos e hipertensos esenciales. Utilizando el intervalo de confianza del 95% de la población normotensa como límite superior de la normalidad (87 $\mu\text{mol/l}$ células), seis pacientes hipertensos esenciales muestran valores anormalmente altos de K_{Ca} .

flujo de Sr^{2+} (fig. 3, derecha), a partir de la cual puede estimarse la constante de disociación para el Ca^{2+} .

En experimentos previos pudo observarse que el flujo de salida de Sr^{2+} exhibía las características de un flujo mediado por la bomba de calcio, dado que era inhibido por el La^{3+} , por la depleción de ATP y por el Ca^{2+} intracelular. Asimismo, la sustitución del Na^{+} extracelular no modificaba dicho flujo.

Los resultados de este trabajo demostraron unas diferencias significativas en los parámetros cinéticos de la bomba de calcio eritrocitaria entre hipertensos y normotensos. Tal como puede observarse en la tabla II, los valores de las constantes de disociación para el Ca^{2+} y Sr^{2+} intracelulares, así como la velocidad máxima de flujo, se encontraban claramente aumentadas en los hipertensos esenciales.

La figura 4 muestra los valores individuales de la constante de disociación para el Ca^{2+} intracelular en todos los sujetos estudiados. Puede observarse que dicho parámetro muestra una distribución bimodal

en la HTA esencial. Así, utilizando el intervalo de confianza del 95% como límite superior de la normalidad, un subgrupo de 6 pacientes hipertensos mostraban valores claramente elevados (116 ± 7 $\mu\text{mol/l}$ céls).

Estos resultados confirmaron las observaciones de Dagher y cols.⁶³ en el sentido de que la HTA primaria como entidad única no se asocia a una anomalía de la bomba de calcio eritrocitaria. Contrariamente, la población de hipertensos esenciales es heterogénea por lo que respecta a dicho sistema de transporte. Mientras que la mayoría (75%) presenta una actividad similar a la de la población normotensa, un pequeño subgrupo (25%, hipertensos Ca^{2+} bomba (-)) muestra una alteración de dicha bomba, consistente en una menor afinidad de la proteína transportadora para el calcio intracelular. El aumento de la velocidad máxima de flujo en estos pacientes puede explicarse como mecanismo de compensación al defecto de la afinidad. En analogía a lo que ocurre con la bomba de sodio⁷⁹ en condiciones basales y dependiendo de la concentración intracelular de Ca^{2+} , el flujo de salida mediado por la ATPasa Ca^{2+} -dependiente puede encontrarse normal, aumentado o disminuido. No obstante, estos sujetos con un defecto en la afinidad para-el Ca^{2+} pueden presentar una disminución de la capacidad para la regulación del Ca^{2+} intracelular cuando éste supera los valores basales.

No es aventurado suponer que este defecto en la estimulación del transporte activo del Ca^{2+} pueda, a nivel de las células del músculo liso vascular, provocar una dificultad en la extrusión del exceso de Ca^{2+} libre citosólico que tiene lugar tras la apertura de los canales membranarios cuando se inicia la contracción muscular. El resultado final sería el incremento del Ca^{2+} libre citosólico y consecuentemente del tono de dicha célula, determinante último del incremento de las resistencias periféricas vasculares.

Bibliografía

- Rasmussen H: The calcium messenger system. *N Engl J Med* 314:1094-1101, 1986.
- Postnov YV, Orlov SN, Shevchenko A y Alder AM: Altered sodium permeability, calcium binding and Na, K, ATPase activity in red blood cell membrane in essential hypertension. *Pflugers Arch* 371:268-269, 1977.
- Postnov YV, Orlov SN y Pokudin NI: Decrease of calcium binding by the red blood cell membrane in spontaneously hypertensive rats and in essential hypertension. *Pflugers Arch* 379:191-195, 1979.
- Erne P, Bolli P, Burgisser E y Buhler FR: Correlation of platelet calcium with blood pressure. Effect of the antihypertensive therapy. *N Engl J Med* 310:1084-1088, 1984.
- Bruschi G, Bruschi ME, Caroppo M, Orlandini G, Spaggiari M y Cavatorta A: Cytoplasmic free $[\text{Ca}^{2+}]$ is increased in the platelets of spontaneously hypertensive rats and essential hypertensive patients. *Clin Sci* 68:179-184, 1985.
- Blaustein MP y Nelson MT: Sodium-calcium exchange: its role in the regulation of cell calcium. En: Carafoli E, ed. *Membrane transport of calcium*. London, Academic Press 217-236, 1982.
- Schatzmann HJ: ATP dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. *Experientia* 22:364-365, 1966.
- Minocherhomjee AM, Beauregard G, Potier M y Roufogalis BD: The molecular weight of the Ca^{2+} -transport ATPase of the human red blood cell determined by radiation inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* 116:895-900, 1983.
- Cavieser JD: Calmodulin and the target size of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase of human red cell ghosts. *Biochim Biophys Acta* 771:241-246, 1984.
- Hymel L, Nielsen M, Gietzen K. Target size of human erythrocyte membrane Ca^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities in the presence and absence of calmodulin. *Biochim Biophys Acta* 815:461-467, 1985.
- Lew VL, Tsien RY, Miner C y Bookchin RM: Physiological (Ca^{2+}) level and pumpleak in intact red cells measured using incorporated Ca chelator. *Nature* 298:478-481, 1982.
- Kraijte RB, Garrahan PJ y Rega AF: Two modes of inhibition of the Ca^{2+} pump in red cells by Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 816:365-378, 1985.
- Schatzmann HJ: The red cell calcium pump. *Ann Rev Physiol* 45:303-312, 1983.
- Richards DF, Rega AF y Garrahan PJ: Two classes of site for ATP in the Ca^{2+} ATPase from human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 511:194-211, 1978.
- Schatzmann HJ: The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal cells. En: Carafoli E, ed. *Membrane Transport of Calcium*. London, Academic Press 41-108, 1982.
- Simons TJB: Active transport of lead by human red cells. *FEBS Lett* 172:250-254, 1984.
- Rossi JFPC y Schatzmann HJ: Is the red cell calcium pump electrogenic? *J Physiol* 327:1-15, 1982.
- Smallwood JI, Waisman DM, Lafreniere D y Rasmussen H: Evidence that erythrocyte calcium pump catalyzes a $\text{Ca}^{2+}:\text{nH}^+$ exchange. *J Biol Chem* 258:11092-11097, 1983.
- Garrahan PJ y Rega AF: Activation of partial reactions of the Ca^{2+} -ATPase from human red cells by Mg^{2+} and ATP. *Biochim Biophys Acta* 513:59-65, 1978.
- Gopinath RM y Vincenzi FF: Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1203-1209, 1977.
- Jarrett HW y Penniston JT: Partial purification of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activator from human erythrocytes. Its similarity to the activator of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 77:1210-1216, 1977.
- Foder B y Scharff O: Decrease of apparent calmodulin affinity of erythrocyte $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase at low Ca^{2+} concentration. *Biochim Biophys Acta* 649:367-376, 1981.
- Scharff O: Ca^{2+} activation of membrane-bound $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -dependent ATPase from human erythrocytes prepared in the presence or absence of Ca^{2+} . *Biochim Biophys Acta* 443:206-218, 1976.
- Vincenzi F: Regulation of a plasma membrane calcium pump: A speculative model. *Ann NY Acad Sci* 307:229-231, 1978.
- Missiaen L, Vrolix M, Raeymaekers L y Casteels R: Regulation of the Ca^{2+} -transport ATPases of smooth-muscle cells. *Adv Prat Phosphatases* 5:239260, 1989.
- Wuytack F, De Schutter G y Casteels R: Purification of $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from smooth muscle by calmodulin affinity chromatography. *FEBS Lett* 129:297-300, 1981.
- Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Hofmann F y Casteels R: Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasmalemmal Ca^{2+} pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol. *Biochem J* 255:855-863, 1988.

28. Furukawa KI y Nakamura H: Characterization of the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase purified by calmodulin affinity chromatography from bovine aortic smooth muscle. *J Biochem* 101:287-290, 1987.
29. Eggermont JA, Raeymaekers L y Casteels R: Ca^{2+} -transport by smooth muscle membranes and its regulation. *Biomed Biochim Acta* 48:S370-S381, 1989.
30. Pershadasing HA y McDonald JM: Direct addition of insulin inhibits a high affinity Ca^{2+} -ATPase in isolated adipocyte plasma membranes. *Nature* 281:495-497, 1979.
31. Ghijsen WE y Van Os CH: 1 α ,25-dihydroxy-Vitamin D-3 regulates ATP-dependent calcium transport in basolateral plasma membranes of rat enterocytes. *Biochim Biophys Acta* 689:170-172, 1982.
32. Soloff MS y Sweet P: Oxytocin inhibition of $(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J Biol Chem* 257:10687-10693, 1982.
33. Davis PJ y Blas SD: In vitro stimulation of human red blood cell Ca^{2+} -ATPase by thyroid hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 99:1073-1080, 1981.
34. Verbost PM, Flick G, Lock RAC y Wendelaar Bonga SE: Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J Membr Biol* 102:97-104, 1988.
35. McLennan DH: Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245:4508-4518, 1970.
36. Kirchberger MA y Tada M: Effects of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase on sarcoplasmic reticulum isolated from cardiac and slow and fast contracting skeletal muscles. *J Biol Chem* 251:725-729, 1976.
37. Eggermont JA, Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F y Casteels R: Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Circ Res* 62:266-278, 1988.
38. Raeymaekers L y Jones RL: Evidences for the presence of phospholamban in the endoplasmic reticulum of smooth muscle. *Biochim Biophys Acta* 882:258-265, 1986.
39. Raeymaekers L, Hofmann F y Casteels R: Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem J* 252:269-273, 1988.
40. Orlov SN y Postnov W: Calcium accumulation and calcium binding by the cell membrane of cardiomyocytes and smooth muscle of aorta in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 59 (suppl.):207s-209s, 1980.
41. Postnov W y Orlov SN: Alteration of membrane control over intracellular calcium in essential hypertension and spontaneously hypertensive rats. En: Zumkley H, Losse H, eds. *Intracellular electrolytes and arterial hypertension*. Stuttgart, George Thieme Verlag 144-151, 1980.
42. Devinck MA, Pernollet MG, Núñez AM y Meyer P: Analysis of calcium handling in erythrocyte membranes of genetically hypertensive rats. *Hypertension* 3:397-403, 1981.
43. Wei JW, Janis RA y Daniel EE: Studies of subcellular fraction from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats: alteration in both calcium uptake and enzyme activities. *Blood Vessels* 13:293-308, 1976.
44. Wei JW, Janis RA y Daniel EE: Alterations in calcium transport and binding by the plasma membranes of mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 14:55-64, 1977.
45. Pernollet MG, Devinck MA y Meyer P: Abnormal calcium handling by isolated cardiac plasma membranes from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci* 61:453-462, 1981.
46. Devinck MA, Pernollet MG, Núñez AM y Meyer P: Calcium binding alteration in plasma membrane from various tissues of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 3:797-808, 1981.
47. Postnov W y Orlov SN: Evidence of altered calcium accumulation and calcium binding by the membranes of adipocytes in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 385:85-89, 1980.
48. Forstner J y Manery P: Calcium binding by human erythrocyte membranes. *Biochem J* 124:563-571, 1971.
49. Forstner J y Manery P: Calcium binding by human erythrocyte membranes. Significance of carboxyl, amino and thiol groups. *Biochem J* 125:343-352, 1971.
50. Postnov W y Orlov SN: Ion transport across plasma membrane in primary hypertension. *Physiol Rev* 65:904-945, 1985.
51. Postnov W, Orlov SN, Reznikova MB, Rjazhsky GG y Pokudin NI: Calmodulin distribution and Ca^{2+} transport in the erythrocytes of patients with essential hypertension. *Clin Sci* 66:459-463, 1984.
52. Orlov SN y Postnov W: Ca^{2+} binding and membrane fluidity in essential and renal hypertension. *Clin Sci* 63:281-284, 1982.
53. Orlov SN, Pokudin NI y Postnov YV: Calmodulin-dependent Ca^{2+} transport in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 397:54-56, 1983.
54. Postnov W y Orlov SN: Calmodulin-dependent Ca^{2+} transport across plasma membranes in primary hypertension. *J Hypertens* 1 (Suppl. 2):9-10, 1983.
55. Cirillo M, David-Dufilho M y Devinck MA: Altered active sodium and calcium transport by heart sarcolemmal membranes from young spontaneously hypertensive rats: modulation by calmodulin. *J Hypertens* 2 (Suppl. 3):485-487, 1984.
56. Vezzoli G, Elli M, Tripodi G, Bianchi G y Carafoli E: Calcium ATPase in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats of the Milan strain. *J Hypertens* 3:645-648, 1985.
57. Garay R, Rosati C y Meyer P: Na^{+} transport in primary hypertension. *Ann NY Acad Sci* 488:187-195, 1986.
58. Blaustein MP: Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *Am J Physiol* 232:C165-C173, 1977.
59. Bianchi G, Ferrari P, Trizio D y cols.: Red blood cell abnormalities and spontaneous hypertension in the rat. *Hypertension* 7:319-325, 1985.
60. Cirillo M, Galletti F, Corrado MF y Strazullo P: Disturbances of renal and erythrocyte calcium handling in rats of the Milan hypertensive strain. *J Hypertens* 4:443-449, 1986.
61. Kwan CY, Triggie CR, Groves AK y Daniel EE: Subcellular membrane properties in vascular and non-vascular smooth muscles of Dahl hypertensive rats. *J Hypertens* 4:49-55, 1986.
62. Garay RP y Garrahan PJ: The interaction of adenosine triphosphate and inorganic phosphate with the sodium pump in red cells. *J Physiol* 249:51-67, 1975.
63. Dagher G, Amar M y Kheff A: Red blood cells Ca^{2+} pump is not altered in essential hypertension of humans and Kyoto rats. *Biochim Biophys Acta* 903:218-228, 1987.
64. Orlov SN, Pokudin NI y Postnov W: Calcium transport in erythrocytes of rats with spontaneous hypertension. *J Hypertens* 6:829-837, 1988.
65. Oshima T, Young EW, Bukoski RD y McCarron DA: Abnormal calcium handling by platelets of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 15:606-611, 1990.
66. Olorunsogo OO, Okudolo BE, Lawal SOA y Falase AO: Erythrocyte Ca^{2+} -pumping of hypertensive humans: reduced stimulation by calmodulin. *Bioscience Rep* 5:525-531, 1985.
67. Resinck TJ, Tkachuk VA, Erne P, Buhler FR: Platelet membrane calmodulin-stimulated calcium-adenosine triphosphatase. Altered activity in essential hypertension. *Hypertension* 8:159-166, 1986.
68. Vincenzi FF, Morris CD, Kinsel LB, Kenny M y McCarron DA: Decreased calcium pump adenosine triphosphatase in red blood cells of hypertensive subjects. *Hypertension* 8:1058-1066, 1986.
69. Vincenzi FF: The pharmacology of calmodulin antagonism: a reappraisal. En: Kakiuchi S, Hidaka H, Means A, eds. *Calmodulin and intracellular Ca^{2+} receptors*. New York, Plenum Medical 1-17, 1982.

A. DE LA SIERRA

70. De la Sierra A, Hannaert P, Ollivier JP, Senn N y Garay R: Kinetic study of the Ca^{2+} pump in erythrocytes from essential hypertensive patients. *J Hypertens* 8:285-293, 1990.
71. Schatzmann HJ y Vincenzi FF: Calcium movements across the membrane of human red cells. *J Physiol* 201:369-395, 1969.
72. Olson EJ y Cazort RJ: Active calcium and strontium transport in human erythrocyte ghosts. *J Gen Physiol* 53:311-322, 1969.
73. Schatzmann HJ: Active calcium transport and Ca^{2+} -activated ATPase in human red cells. En: Bronner F, Kleinzeller A, eds. *Current topics in membrane and transport*. New York, Academic Press 125-168, 1975.
74. Quist EE y Roufogalis BD: Determination of the stoichiometry of the calcium pump in human erythrocytes using lanthanum as a selective inhibitor. *FEBS Lett* 50:135-139, 1975.
75. Pflieger H y Wolf HU: Activation of membrane-bound high-affinity calcium ionsensitive adenosine triphosphatase of human erythrocytes by bivalent metal ions. *Biochem J* 147:359-361, 1975.
76. Ferreira HG y Lew VL: Use of ionophore A23187 to measure cytoplasmic Ca buffering and activation of the Ca pump by internal Ca^{2+} . *Nature* 259:47-49, 1976.
77. Lew VL y García-Sancho J: Use of the ionophore A23187 to measure and control cytoplasmic Ca^{2+} levels in intact red cells. *Cell Calcium* 6:15-23, 1985.
78. Sarkadi B, Szasz I, Gerloczy A y Gardos G: Transport parameters and stoichiometry of active calcium extrusion in intact human red cells. *Biochim Biophys Acta* 464:93-107, 1977.
79. Díez J, Hannaert P y Garay R: Kinetic study of the $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}$ pump in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Am J Physiol* 252:H1-H6, 1987.